

**Die Bedeutung der alpha-Glucosidase-Aktivitäten
im Urin als Untersuchungsmethode zur
Diagnostik der Glycogenose Typ II
(morbus Pompe)**

Angelika Bayerl-Förster

1977

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Aus der Kinderklinik der Universität München
im Dr. v. Haunerschen Kinderspital
Direktor: Prof. Dr. Klaus Betke

Die Bedeutung der alpha-Glucosidase-Aktivitäten
im Urin als Untersuchungsmethode zur Diagnostik
der Glycogenose Typ II (morbus Pompe)



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt
und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Angelika Bayerl-Förster
aus
Würzburg
1976

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Schaub
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Klaus Betke
Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 25. 10. 1977



Einleitung

Erste Abtheilung

Zweite Abtheilung

Dritte Abtheilung

Vierte Abtheilung

Fünfte Abtheilung

Sechste Abtheilung

Siebente Abtheilung

Achte Abtheilung

Neunte Abtheilung

Zehnte Abtheilung

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsangabe

Einleitung S. 1

Material S. 6

Methodenkritik S. 7

Methoden S. 8

Statistische Bearbeitung S. 10

Ergebnisse S. 12

Statistische Berechnungen S. 28

Diskussion S. 35

Zusammenfassung S. 45

Literaturverzeichnis S. 46

GLIEDERUNG

1. Einleitung
2. Aufgabenstellung
3. Material und Methoden
 - 3.1. Chemikalien und Geräte
 - 3.2. Proben
 - 3.3. Kreatininbestimmung
 - 3.4. Methodenkritik
 - 3.4.1. Fluoreszenztest
 - 3.4.2. Testansatz
 - 3.4.3. Aktivitätsberechnung
 - 3.4.4. Turanosehemmung
 - 3.4.5. Hitzeinaktivierung
 - 3.4.6. Dialyse
 - 3.5. Statistische Bearbeitung
 - 3.5.1. Wilcoxontest
 - 3.5.2. Graphische Bearbeitung der Parameter m_1 und m_2
4. Ergebnisse
 - 4.1. Zusammenstellung aller untersuchten Urine
 - 4.2. Dialyse
 - 4.3. Hitzeinaktivierung
 - 4.4. Turanosehemmung
 - 4.5. Quotientenbildung
 - 4.5.1. Aufstellung der Quotienten aus der Aktivität bei pH 4.0 und pH 6.0
 - 4.5.2. Wilcoxontest zum Vergleich aus pH 4.0 und pH 6.0
 - 4.6. Vergleich der pH- Optima
 - 4.6.1. Darstellung der pH- Optima
 - 4.6.2. Wilcoxontest zum Vergleich der pH- Optima
 - 4.7. Vergleich der beiden Wilcoxon-Tests
 - 4.8. Auswertung der Parameter m_1 und m_2
5. Diskussion
6. Zusammenfassung

1. Einleitung

1962 beschrieb Hers (1) als Erster den Enzymdefekt der schon lange bekannten Glycogenose Typ II, einem autosomal recessiven Erbleiden. Er konnte zeigen, daß bei den betreffenden Patienten das Enzym alpha-1,4,-Glucosidase in der Leber fehlt. Dieser Defekt betrifft auch Herzmuskel (2), Skelettmuskel (2), Gehirn (3), Pankreas (3), kultivierte Hautfibroblasten (4 und 5) und Leukozyten (4 und 6).

Dabei erkannte er, daß zwei gut zu unterscheidende Formen des Enzyms existieren. Sie ließen sich vor allem durch ihre pH-Optima, nämlich von 3.5 und 7, unterscheiden. Bei den Patienten mit Glycogenose Typ II ließ sich das Enzym mit dem pH im sauren Bereich nicht in der Leber nachweisen.

In Studien über die Zellkompartimentierung der zwei Formen des Enzyms konnten Lejeune und Mitarbeiter (7) zeigen, daß das Enzym mit dem pH-Optimum im sauren Bereich sich in seiner Verteilung innerhalb der Zelle wie die saure Phosphatase verhält, daß man es also in die lysosomale Fraktion einordnen konnte. Das Enzym mit dem pH-Optimum im neutralen Bereich folgte der Aktivität der Glucose-6-Phosphatase, kann also in der mikrosomalen und löslichen Fraktion lokalisiert werden. In Dichte-Gradient-Trennungen folgte die "saure Maltase" der Anreicherung der Lysosomen, die Aktivität bei pH 7 war zum großen Teil gebunden an Mikrosomen, ließ sich aber auch in der löslichen Fraktion messen. Außer diesen Kriterien kann man die beiden Enzyme noch durch ihr unterschiedliches Verhalten bei der Inaktivierung durch Hitze und bei der Hemmung mit Turanose unterscheiden. Die Untersuchung von Lejeune und Mitarbeitern (7) ergab, daß Turanose die lysosomale Maltase bis zu 100 % hemmen kann, wohingegen das mikrosomale und lösliche Enzym keine Inhibition durch Turanose zeigt. Im Gegensatz dazu konnten Fluharty und Mitarbeiter (8) feststellen, daß bei einem

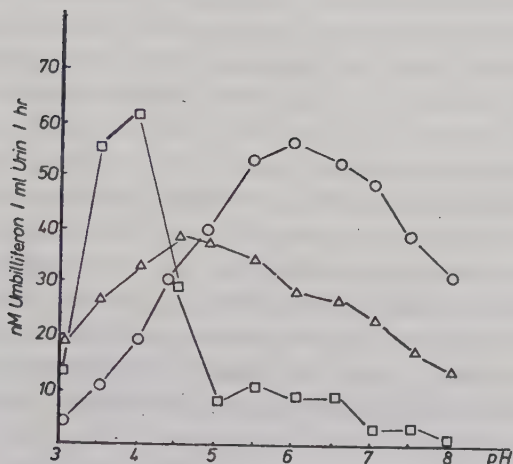
Vergleich des lysosomalen Enzyms mit einem Enzym aus Amnionflüssigkeit, das sie bei pH 5.8 gemessen hatten, dieses letztere Enzym durch Hitzeinaktivierung nahezu völlig gehemmt wurde, während das saure Enzym keine Reaktion zeigte.

Überraschenderweise beschrieben Steinitz und Rutenberg (3), wie auch Salafsky und Nadler (9) im Nierengewebe ein weiteres Enzym, mit einem pH-Optimum bei 5.5. Dieses Nierenenzym verhielt sich auch in der elektrophoretischen Auftrennung anders (10). Erwartungsgemäß enthält der Urin hauptsächlich dieses "Nierenenzym", zusätzlich aber auch Anteile der zuvor beschriebenen Enzyme, die man auch im Serum messen kann (11), die also aus verschiedenen Organen, auch aus Blutzellen stammen können.

Dieses "Nierenenzym" weicht in seinem Verhalten von der sauren Glucosidase weiterhin dadurch ab, daß es auch bei Patienten mit einer Glycogenose Typ II in normaler Aktivität vorhanden ist. Man kann daher die Diagnose dieser Erkrankung nicht durch eine Untersuchung des Nierengewebes stellen. Bei Patienten mit M.Pompe kann man daher eine normale Ausscheidung von "Nierenenzym" erwarten, jedoch eine verringerte Ausscheidung des sauren Enzyms, das durch Filtration des Plasmas ausgeschieden wird und daher wahrscheinlich aus anderen Organen stammt (11).

1973 veröffentlichten Salafsky und Nadler (12) Untersuchungsergebnisse über α -Glucosidase im Urin. Dabei verglichen sie drei Gruppen miteinander, und zwar vier Personen zwischen 6 und 32 Jahren, zehn Kinder bis 2 Jahre und 2 Kinder mit M.Pompe. Die Kurven aus den Aktivitätsmessungen zeigten nun bei der ersten Gruppe eine angedeutet zweigipflige Form mit Optima bei pH 4.0 und 5.5, bei den Kleinkindern eine breite, eingipflige Form mit Optimum bei pH 5.0, und bei den Patienten mit M.Pompe einen breiten, eingipfligen Verlauf mit sehr hoher Aktivität und einem Optimum bei pH 6.0 (Abb.1)

Abbildung 1



pH-abhängige Aktivitätskurven der α -Glucosidase im Urin von 4 Erwachsenen, 10 Kindern, und 2 Patienten mit M.Pompe. Die Aktivität ist ausgedrückt in nanoMole 4-Methyl-umbilliferon/hrs/ml Urin. Entnommen aus Salafsky und Nadler "Deficiency of acid alpha Glucosidase in the Urine of Patients with Pompe's Disease" (14)
 □ = Erwachsene, △ = Kinder, ○ = Pompe

Da die Einzelmessungen innerhalb der einzelnen Gruppen sehr unterschiedliche Ergebnisse aufwiesen und somit der Unterschied zwischen den Kontrollgruppen und der Gruppe der Pompe-Patienten nicht klar zu erkennen war, bildeten die Autoren den Quotienten aus den Aktivitäten bei pH 4.0 und 6.0. Die Streuung innerhalb der einzelnen Gruppen wurde dadurch geringer, der zahlenmäßige Unterschied zwischen den Gruppen dafür deutlicher. Mit diesem Quotienten schien es auch erstmals möglich, bei Patienten mit M.Pompe eine

Diagnose aus dem Urin zu stellen, da der Wert aus pH4/pH6 in dieser Gruppe unter den vergleichbaren Ergebnissen der Kontrollgruppen lag. Da Urin im Gegensatz zu Leber, Leukozyten, Fibroblasten oder anderen Geweben als Untersuchungsmaterial leicht zu gewinnen ist, schien dieses Ergebnis eine wertvolle Bereicherung in der Diagnostik des M.Pompe zu sein.

In neuerer Zeit hat sich bei einer Reihe von Enzymdefekten die Möglichkeit eröffnet, bereits eine pränatale Diagnostik der Krankheit durchzuführen, einerseits mit der Möglichkeit des therapeutischen Abortes oder mit dem gezielten Erhalt einer sonst vielleicht unerwünschten Schwangerschaft bei genetischer Belastung, andererseits mit der Möglichkeit, eine vielleicht notwendige Therapie oder Diät bereits präpartal beginnen zu können (Methylmalonacidurie (13)).

Im Falle des alpha-Glucosidase-Mangels, dem M.Pompe, gelang eine pränatale Diagnostik erstmals Nadler und Messina 1969 (14), da der Enzymdefekt wie in anderen Zellen so auch in Amnionzellen ausgeprägt ist (15, 16). Im Gegensatz zu einigen anderen Enzymdefekten, z.B. Galactosämie, Mucopolysaccharidosen, die sich aus der Bestimmung von kultivierten Amnionzellen diagnostizieren lassen (18), kann die Beurteilung der Enzymaktivität der alpha-Glucosidase, die sich gelöst im Fruchtwasser findet, zu falschen Ergebnissen führen. Mögliche Fehler durch meßbare Fruchtwasseraktivität bei einem Föten mit M.Pompe sind wahrscheinlich aus dem Ursprung der Amnionflüssigkeit zu erklären, denn ein großer Teil stammt aus der Urinproduktion des Föten. Wie oben erwähnt, scheidet dieser auch bei Vorliegen eines M.Pompe das Nierenenzym aus.

2. Aufgabenstellung

Angeregt durch die Ergebnisse von Salafsky und Nadler (12) über die Aktivität der α -Glucosidase im Urin sollte diese Methode soweit ausgearbeitet werden, daß eine routinemäßige Diagnostik ermöglicht würde. Mit einer größeren Zahl von Untersuchungen sollte überprüft werden, inwieweit diese Methode eventuell sogar zur Bestimmung des Heterozygotenstatus brauchbar ist. Da bei einer pränatalen Diagnostik der Gedanke an die Sicherung einer Heterozygotie oft erst während der Schwangerschaft auftritt, sollte auch untersucht werden, inwieweit der Urin von schwangeren Frauen sich gleich oder verschieden zu nicht-schwangeren Frauen verhält.

Es sollten daher Urine von normalen Frauen, schwangeren Frauen, normalen Kindern, wie auch, soweit bei der Seltenheit der Erkrankung möglich, Patienten mit M.Pompe und deren Eltern und Verwandte untersucht werden.

Als Parameter sollten die pH-Optima der α -Glucosidase im Urin bei den verschiedenen Gruppen auch mit den Methoden von Turanose-Hemmung und Hitzeinaktivierung bestimmt und bei auftretenden Unterschieden miteinander verglichen werden. Eine weitere Aussage sollte über den Vergleich der Kurvenform angestrebt werden, die man über die Enzymaktivität bei verschiedenen pH-Werten erhält. Auf diese Weise sollten eventuell unterschiedliche Anteile der "Isoenzyme", die möglicherweise im Urin erscheinen, verglichen werden.

3. Material und Methoden

3.1. Chemikalien und Geräte

4-Methyl-Umbilliferyl-a-D-Glucosid 1mM (Muf)

von Sigma Chemical Company, Saint Louis

4-Methyl-Umbilliferon 0.2mM und 0.02mM

von Sigma Chemical Company, Saint Louis

Turanose 120mM von Serva, Heidelberg

Kreatinin von Merck, Darmstadt

Pikrinsäure von Merck, Darmstadt

Mc Ilvaine Puffer

Ein Citrat-Phosphat-Puffer, der durch Titration
von 0.2M Citronensäure mit 0.4M Dinatrium-
phosphat auf den gewünschten pH von 3.0, 3.25,
3.50, ..., 7.75, 8.0 gebracht wurde.

Glycin-Puffer 1M pH 10.5 mit NaOH

Dialyse-Puffer : Kalium-Phosphat-Puffer
pH 7, 10mM

Photometer von Eppendorf

Fluorometer von Carl Zeiss M₄ QIII
mit zwei Monochromatoren

Labor-Zentrifuge von Heraeus Christ GmbH

Visking Dialyse-Schlauch 16mm Durchmesser

3.2. Proben

1 Portion Spontanurin von 25 schwangeren Frauen im Alter
von 17 - 35 Jahren aus der 1. Frauenklinik der Univer-
sität München

1 Portion Spontanurin von 15 Säuglingen aus dem Dr. v.
Haunerschen Kinderspital

1 Portion Spontanurin von 12 nicht-schwangeren Frauen
im Alter von 20 - 35 Jahren

1 Portion Spontanurin von 4 Säuglingen, die an Pompe er-
krankt sind und 8 Angehörigen von ihnen; dieser Urin wurde

in Plastikversandgefäßen der Firma Boehringer Mannheim bei Raumtemperatur verschickt und sofort nach der Ankunft tiefgefroren.

Die anderen Urine wurden sofort nach der Gewinnung tiefgefroren und ebenso wie die der Pompe-Gruppe bei -40°C bis zur Verarbeitung aufgehoben.

Zur Bearbeitung wurde der Urin langsam auf Zimmertemperatur erwärmt und zentrifugiert.

3.3. Kreatinin-Bestimmung nach Jaffé

Dazu wurden angesetzt

1 Leerwert

0.2ml Wasser, 0.2ml NaOH 10%ig, 2ml Pikrinsäure 1.2%ig

2 Proben

0.1ml Wasser, 0.1ml Urin, 0.2ml NaOH 10%ig, 2ml Pikrinsäure 1.2%ig

3 Standards

0.1ml Wasser 0.1 ml Kreatininstandard (100 mg% Kreatinin in 1M HCl), 0.2 ml NaOH 10%ig, 2ml Pikrinsäure 1.2%

Die Proben standen 10 min bei Raumtemperatur, anschließend wurden 7.6 ml aqua dest. zugefügt und bei 546 nm am Photometer gegen den Leerwert abgelesen.

3.4. Methodenkritik

Zur Messung des Enzyms stehen mehrere Methoden zur Verfügung. Hers (1) benutzte die Spaltung von Glycogen oder Maltose und bestimmte die entstehende Glucose. Weiterhin besteht in der Möglichkeit des Enzyms, den umgekehrten Weg zu katalysieren, d.h. Glucose in ein Startermolekül Glycogen oder Maltose einzubauen, ein Weg zur Enzymmessung. Bei Verwendung von radioaktivmarkierter Glucose kann man den Einbau über die Messung von radioaktivmarkiertem Glycogen nach der Inkubation verfolgen.

Neue Möglichkeiten für einfache Tests wurden gegeben, als man in die Lage versetzt wurde, künstliche Substrate herzustellen. Zunächst verwandte man Glucose, an die ein

Molekül p-Nitrophenol α -glucosidisch gebunden ist. Das Enzym spaltet auch dieses Substrat mit hoher Spezifität. Das freigesetzte p-Nitrophenol kann photometrisch bei 405 nm gemessen werden (20).

Einen weiteren Fortschritt stellte die Konjugation von Glucose mit 4-Methyl-Umbilliferon dar. Auch dieses künstliche Substrat wird von dem Enzym mit hoher Spezifität gespalten. Das freigesetzte 4-Methyl-Umbilliferon fluoresziert im alkalischen Milieu sehr stark und kann so einfach gemessen werden. Diese Methode wurde hier wegen der großen Genauigkeit benutzt.

3.4.1. Fluoreszenz-Test

Der Test basiert auf der Bestimmung des durch die Enzymaktivität freigesetzten Methylumbilliferons, das ein Anregungsmaximum von 350 nm besitzt und eine Fluoreszenz bei 448 nm emittiert.

Wegen einer geringen Eigenfluoreszenz auch des noch nicht gespaltenen Substrates erfolgt die Messung der inkubierten Proben gegen einen Standardwert ohne Enzym; das Ergebnis der Messung wird in nmol Umbilliferon ausgedrückt.

3.4.2. Der Testansatz bestand aus

50 μ l McIlvaine Puffer wie oben beschrieben

(siehe 2.1.)

50 μ l dest. Wasser

50 μ l Methylumbilliferyl- α -D-Glucosid

50 μ l Urin

200 ml Testvolumen

Der Test wurde gestartet durch die Zugabe des Urins. Die Inkubation erfolgte über zwei Stunden bei 37° C im Wasserbad. Der Test wurde gestoppt durch Zugabe von 2.0ml Glycin - Puffer (wie in 3.1. beschrieben) 1 M pH 10.5.

Unmittelbar danach wurden die Proben im Fluorometer gemessen. Außerdem wurde für jede Serie eine Testlösung mitgemessen, die dieselbe Zusammensetzung hat wie die Fluoreszenz-Test-Lösung, aber nicht inkubiert wurde.

Als Standard wurde ein Ansatz wie folgt hergestellt

50 µl Puffer

50 µl Methylumbilliferon 0.02 und 0.2mM

100 µl Dest.Wasser

3.4.3. Enzymaktivitäts-Berechnung

Die Berechnung der Enzymaktivität basiert auf der Messung der gebildeten nMole Methylumbilliferon pro Min und pro Milligramm Kreatinin/100 ml Urin

Hierzu wurde folgende Formel verwandt

Nanomale Methylumbilliferon im Standard x
x Transmission der Probe

$$\frac{\text{Transmission Standard} \times \text{Probevolumen in ml}}{\text{x Zeit in min} \times \text{Kreatininkonzentration in mg\%}} = \text{Nanomole freigesetztes Muf/Min/mg Kreatinin}$$

3.4.4. Turanose - Hemmung

Zur Charakterisierung der gemessenen Enzymaktivitäten wurden auch Messungen der Enzymaktivität im Urin unter Inhibition durchgeführt (8). Hierzu wurde parallel zu der üblichen Testreihe eine Reihe mit den gleichen pH-Werten wie oben, jedoch mit Turanose in einer Endkonzentration von 30 mM angesetzt.

Der Ansatz lautet dann

50 µl Puffer

50 µl Turanose 120 mM

50 µl Methylumbilliferyl-α-D-Glucosid

50 µl Urin

200 µl Testvolumen

Die weiteren Schritte folgten wie für den oben beschriebenen Test (3.4.1.)

3.4.5. Hitzeinaktivierung

Entsprechend den Ergebnissen von Fluharty et alii (9) wurden Versuche über die thermische Labilität der Urinenzyme durch Hitzeinaktivierung durchgeführt. Nach den Angaben in dieser Veröffentlichung erfolgte hierzu eine Vorbehandlung des später zu testenden Urins durch Inkubation bei 50° C für 30 Minuten. Zuvor wurde der Urin durch Hinzufügen von McIlvaine-Puffer auf einen pH-Wert von 5.0 gebracht. Der Urin wurde dabei im Verhältnis 1:5 mit dem Puffer verdünnt. Nach der Inkubation wurde der Urin bei 2000 UpM zentrifugiert. Die Enzymmessung erfolgte dann wie in 3.4.1. beschrieben.

3.4.6. Dialyse

In einigen Versuchen wurde der Urin vor der Enzymmessung dialysiert. Die Dialyse erfolgte bei 5° C über 24 Stunden gegen 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer. Nach der Dialyse wurde der Urin bei 2000 UpM zentrifugiert. Die Enzymmessung erfolgt wie in 3.4.1. beschrieben. Die Dialysen wurden durchgeführt, um einen möglichen Einfluß von kleinmolekularen Substanzen, die bei einer Dialyse eliminiert werden können, auf die Enzymaktivität zu erfassen.

3.5. Statistische Bearbeitung

3.5.1. Zum Vergleich der pH - Optima verschiedener untersuchter Gruppen wurden die höchsten gemessenen Werte einer Testserie miteinander verglichen. Da eine sichere Normalverteilung nicht nachgewiesen werden konnte, wurde der "Test für unverbundene Stichproben" nach Wilcoxon benutzt. Mit Hilfe dieses Testes kann nachgeprüft werden, ob zwei Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammen (23).

In unserem Falle wird also aus der Gesamtheit der Fälle einer Gruppe eine Stichprobe gebildet und diese dann mit der Gesamtheit einer zweiten Gruppe als Stichprobe verglichen, um festzustellen, ob sie nun der gleichen Grundeinheit angehören oder nicht.

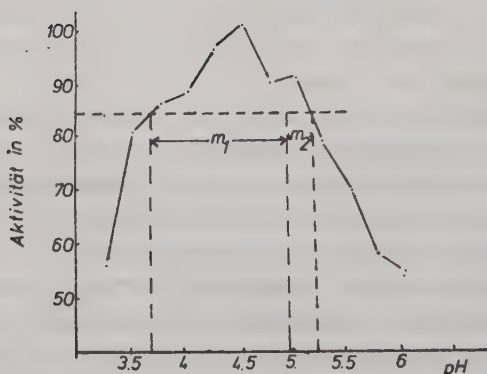
Das zahlenmäßige Ergebnis läßt sich aus der Tabelle für die korrigierte Testgröße errechnen, wobei als Grenze zwischen signifikantem Unterschied und wahrscheinlicher Gleichheit der beim Wilcoxon-Test übliche Wert $p=0.05$ das heißt, das 5% - Niveau angenommen wurde.

Für den Test stellte das "Institut für Medizinische Datenverarbeitung bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung GmbH" freundlicherweise einen Computer zur Verfügung. Weiterhin wurde zur Berechnung das Rechenzentrum der II. medizinischen Klinik der Universität München in Anspruch genommen.

Eine weitere Möglichkeit, eventuell unterschiedliche Enzymaktivitätskurven in bezug auf verschiedene pH-Werte zahlenmäßig zu erfassen, wurde durch folgende Auswertung gefunden:

Wegen der großen Streuung der absolut gemessenen Enzymaktivitäten wurden die Werte durch Umrechnung auf Prozent vom höchsten gemessenen Wert egalisiert. Die graphische Darstellung dieser Kurven aus den Prozentwerten zeigte die Vergleichsmöglichkeit der Strecken m_1 und m_2 an. (Abb. 2). Diese erhält man, wenn man durch eine Linie auf dem 85%-Niveau der Ordinate die Kurve schneiden ließ, und eine weitere Linie über dem pH 5-Wert der Abszisse erhob. Die Strecke m_1 ist also der Abstand des 1. Kurvenschnittpunktes mit der 85%-Linie und dem pH 5, die Strecke m_2 der Abstand zwischen pH 5 und dem zweiten Schnittpunkt mit der 85%-Linie (nach Dr. Blohmer, Ges.für Strahlenforschung). Das 85%-Niveau wurde gewählt, da es der niedrigste Wert war, den alle Kurven mit zwei Schnittpunkten kreuzten. Der pH von 5 war der Wert, bei dem alle m_1 - und m_2 -Strecken mit einem positiven Vorzeichen errechnet werden konnten.

Abbildung 2



Konstruktion der Größen m_1 und m_2
für die graphische Auswertung.
Bezugspunkt ist stets pH 5,

4. Ergebnisse

4.1. Zusammenstellung aller untersuchten Urine

In den Abbildungen 3a bis 3d sind alle untersuchten Urine jeweils einer Gruppe zusammengestellt. Die Aktivitätsangaben für die Kurven erfolgten in Prozent vom höchsten Wert, da die absoluten Einzelwerte bis um den Faktor 300 schwankten (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1

Name	pH4	pH6
Schwangere		
Se	0.025	0.037
Lo	0.027	0.048
Ho	0.035	0.049
Ba	0.046	0.083
Pa	0.050	0.043
Lo	0.064	0.083
We	0.068	0.055
Ei	0.084	0.032
Bo	0.104	0.166
Ke	0.114	0.155
Hu	0.119	0.122
Gü	0.132	0.183
Be	0.147	0.081
Ei	0.202	0.122
Su	0.223	0.191
We	0.229	0.122
Mü	0.245	0.153
Gö	0.256	0.109
St	0.283	0.168
Ha	0.313	0.226
Vo	0.377	0.254
Ga	0.394	0.282
Sc	0.403	0.302
Bl	0.428	0.352
Br	0.527	0.387
Frauen		
Sa	0.014	0.011
Ob	0.018	0.016
Wi	0.024	0.035
Pa	0.026	0.024
St	0.027	0.020
Hr	0.062	0.059
St	0.080	0.087
Fö	0.096	0.058
Wi	0.117	0.061
Ba	0.130	0.068
He	0.215	0.135
Th	0.262	0.141

Name	pH4	pH6
Säuglinge		
Vo	0.092	0.120
Pa	0.128	0.138
Ku	0.144	0.182
Ko	0.163	0.171
Ma	0.172	0.239
Er	0.177	0.557
Ri	0.320	0.294
Ha	0.531	0.932
Pa	0.571	0.640
Ba	0.654	1.342
De	0.870	1.529
We	0.877	2.072
Kl	0.879	0.974
Eg	0.970	1.343
He	1.150	0.777

Pompe-Fälle

AT	0.041	0.071
AP	1.929	4.559
HK	2.429	4.631
MH	2.464	2.789

Pompe-Verwandte

HT	0.010	0.013
HH	0.020	0.019
AH	0.033	0.048
HM	0.055	0.074
HM	0.090	0.091
KV	0.259	0.365
KH	0.780	0.417
KM	2.934	2.582

Tabellarische Zusammenfassung der Aktivität der α -Glucosidase im Urin bei pH4 und pH6, unterschieden nach den untersuchten Gruppen. Die Enzymaktivität ist ausgedrückt in nanoMol/mg Kreatinin/min

Abbildung 3a: Schwangere

ktivität in %

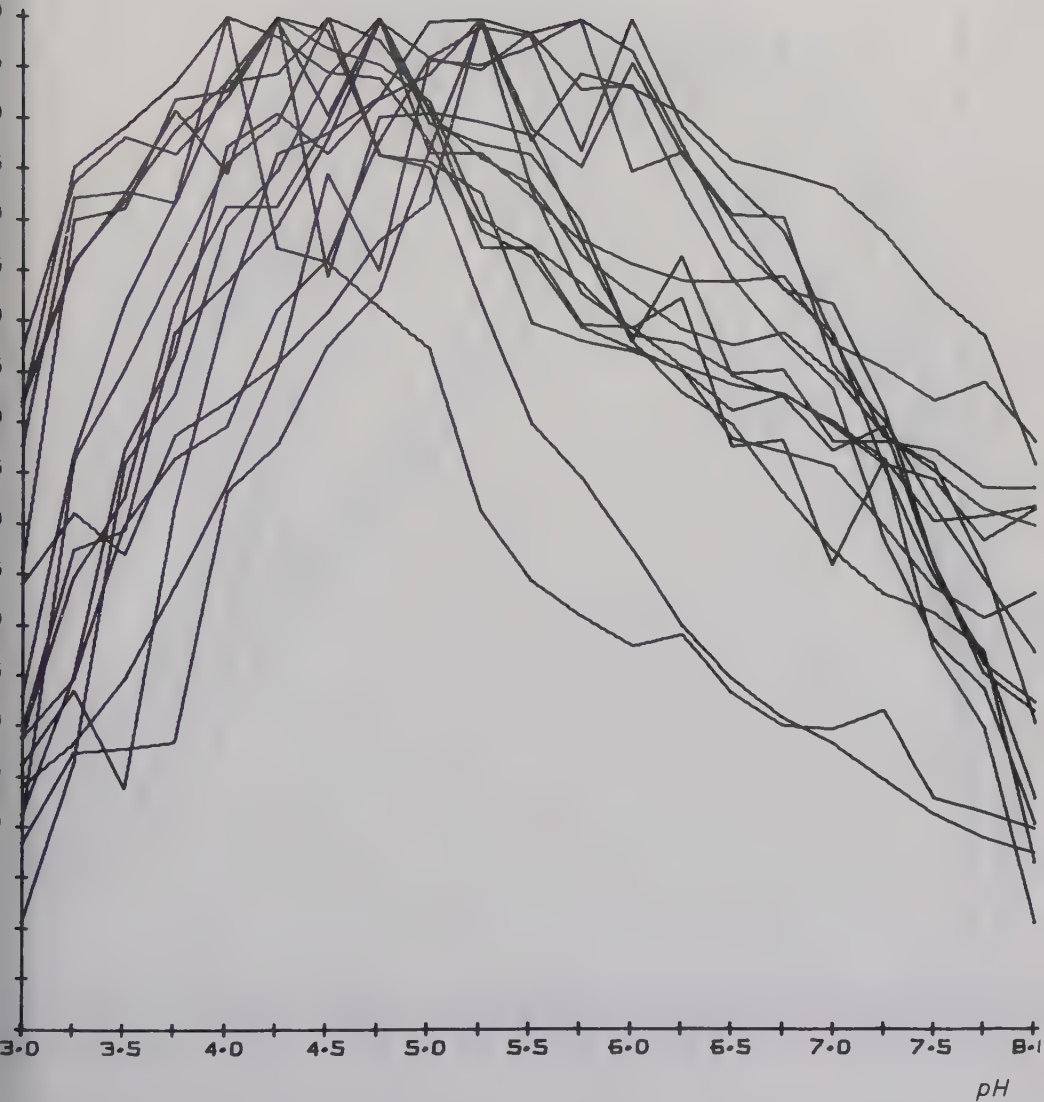


Abbildung 3b: Frauen

Aktivität in %

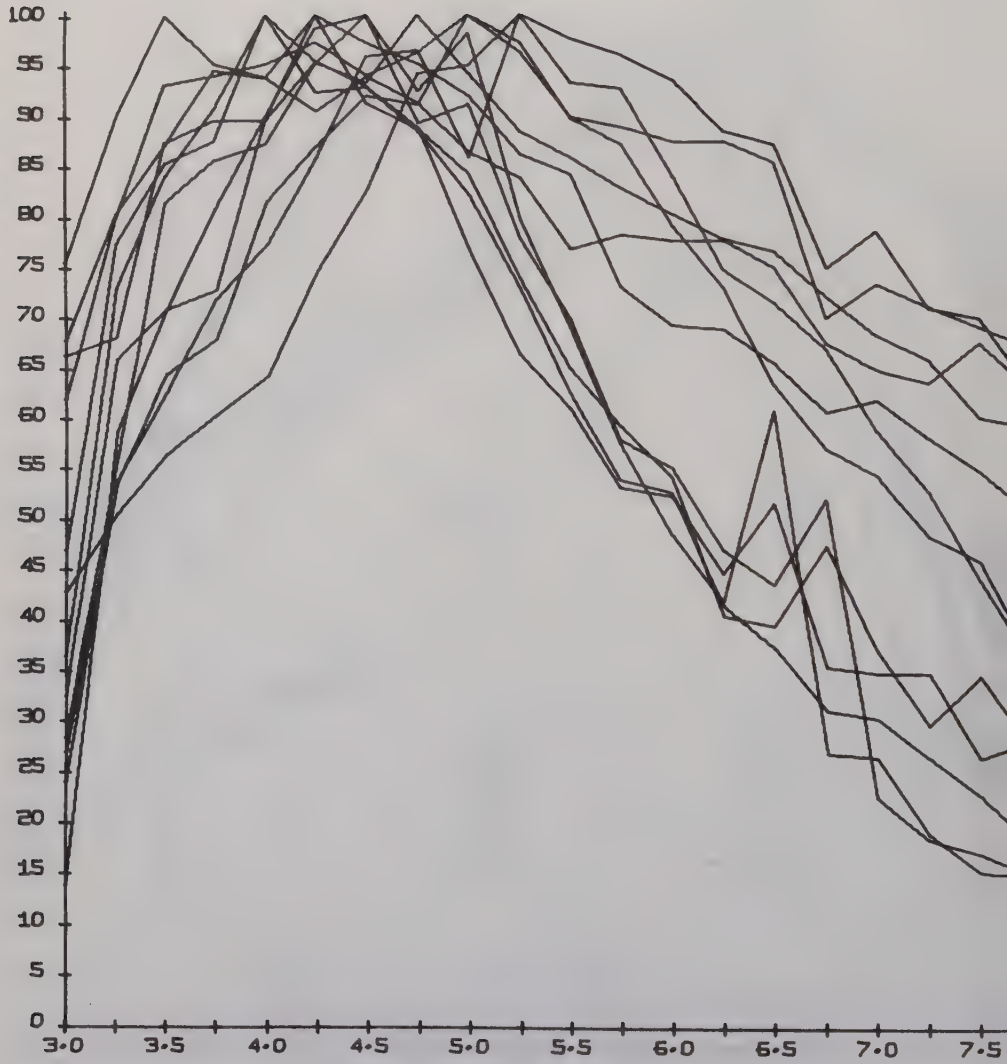


Abbildung 3c: Säuglinge

Aktivität in %

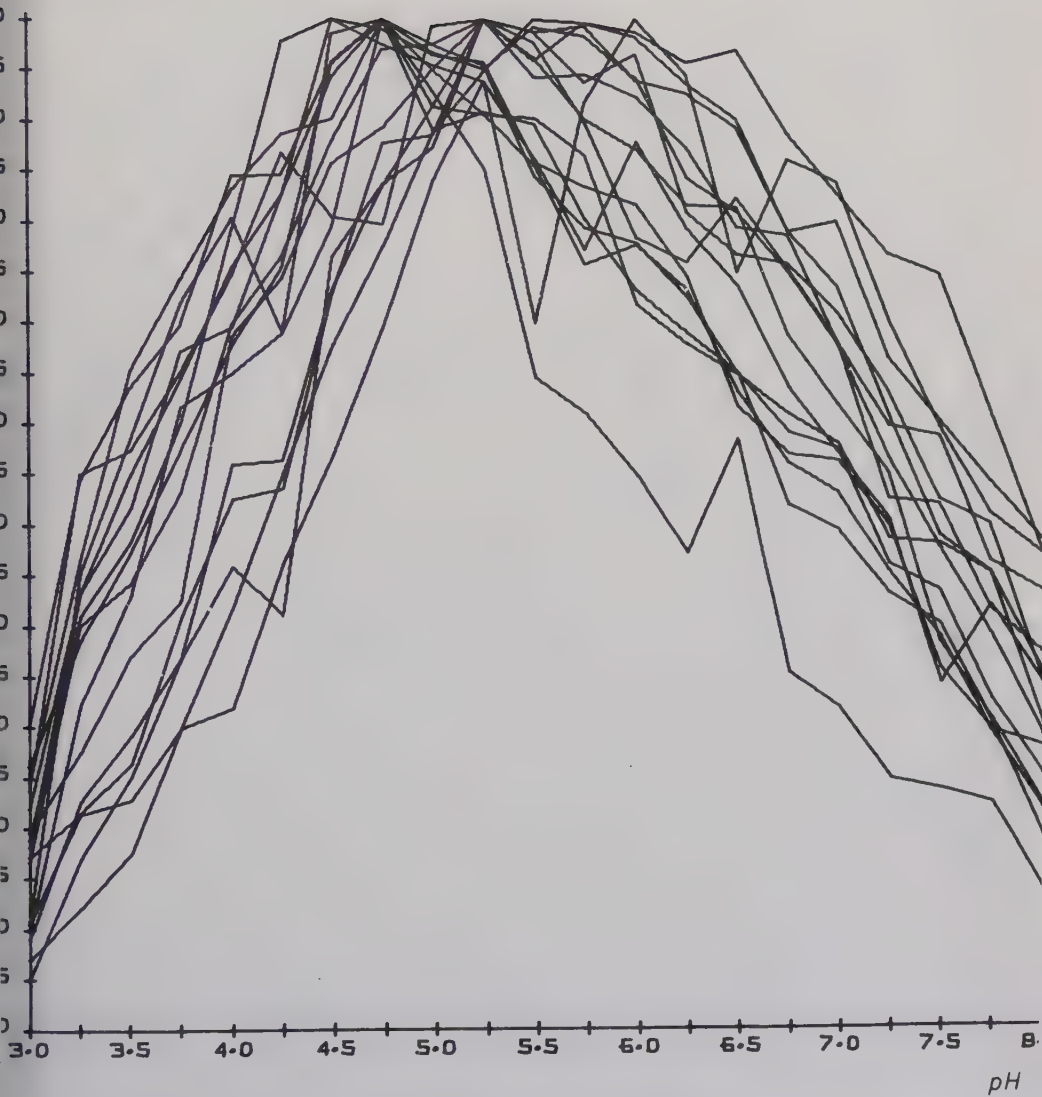


Abbildung 3d: Pompe-Patienten

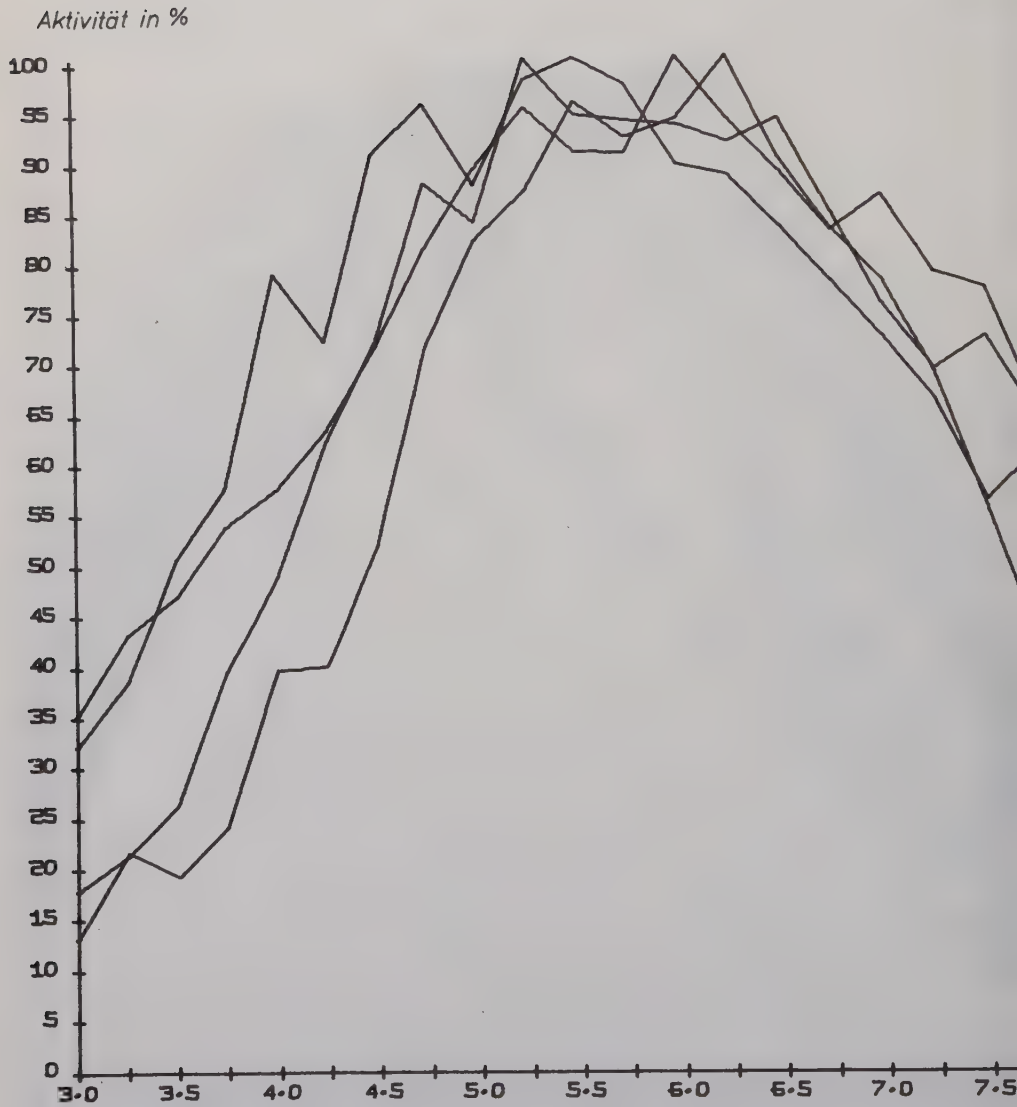
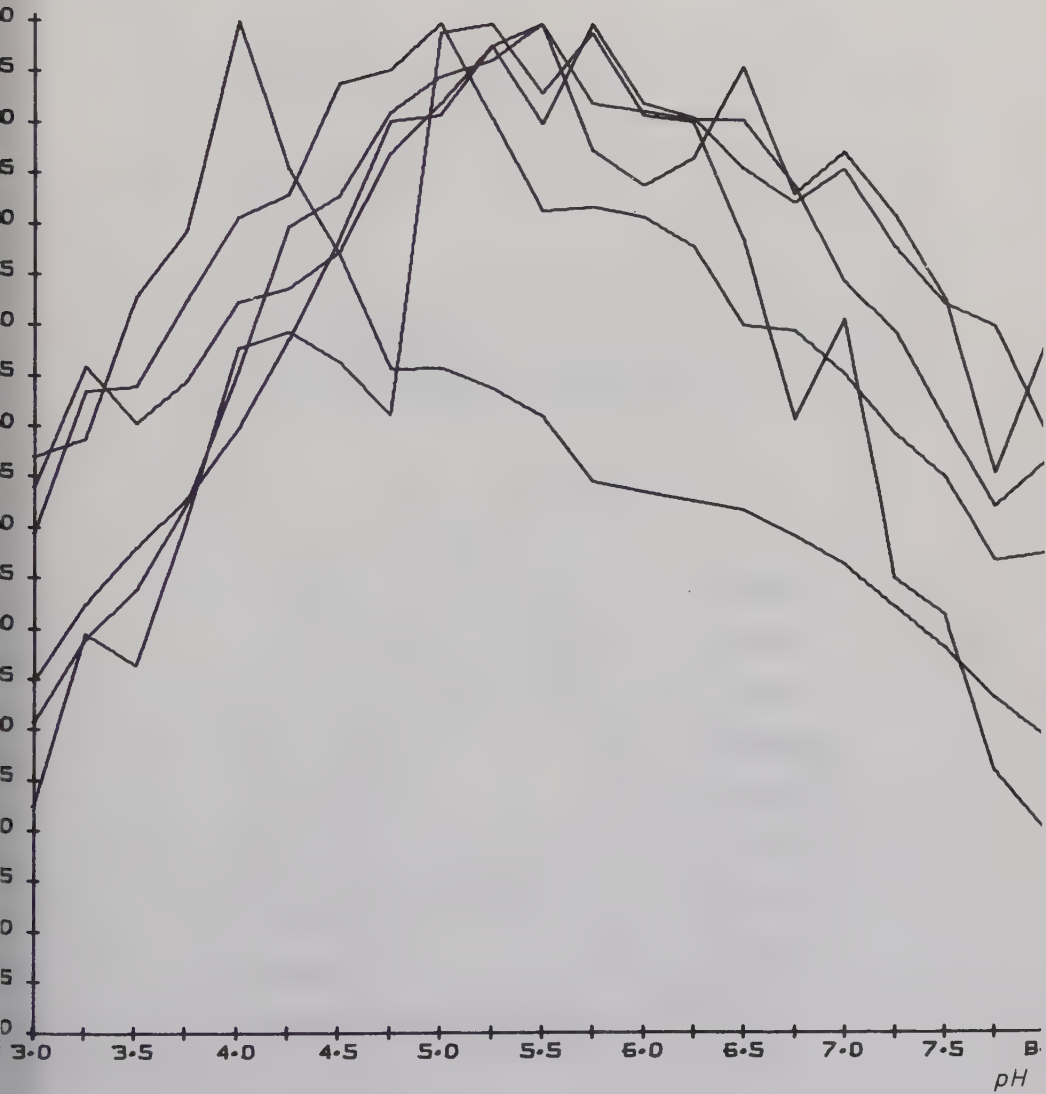


Abbildung 3e: Pompe-Verwandte

Aktivität in %



Graphische Zusammenstellung der Enzymaktivität in allen gemessenen Urinen in Abhängigkeit vom pH-Wert bei den verschiedenen untersuchten Gruppen.

4.2.5. Dialyse

Die Ergebnisse der Dialyse sind in Abbildung 4a bis 4d dargestellt, wobei jede Kurve die Werte eines Einzelurins aus jeder Gruppe repräsentiert. (Durchführung siehe 3.4.6.). Der Urin zeigte nach der Dialyse insgesamt eine sehr verminderte Aktivität der α -Glucosidase, ohne Bevorzugung eines besonderen pH-Bereiches.

Der Aktivitätsverlust betrug bei

- a) Schwangere bei pH4=86.1%, bei pH6=75.5% (Abb. 4a)
- b) Säugling bei pH4=93.3%, bei pH6=79.0% (Abb. 4b)
- c) Frau bei pH4=96.8%, bei pH6=95.0% (Abb. 4c)
- d) Pompe-Fall bei pH4=92.2%, bei pH6=93.1% (Abb. 4d)

Abbildung 4a

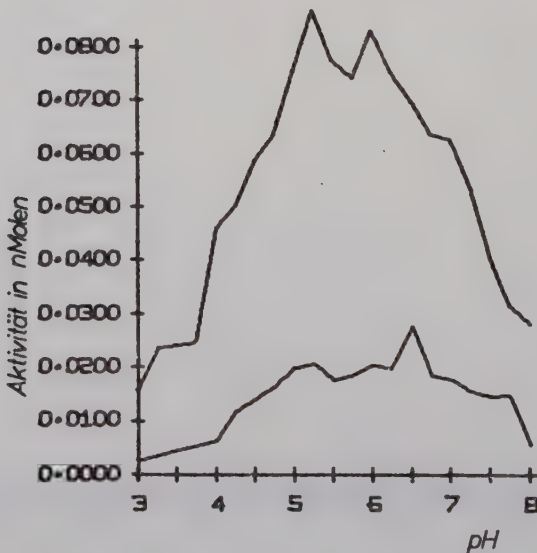


Abbildung 4b

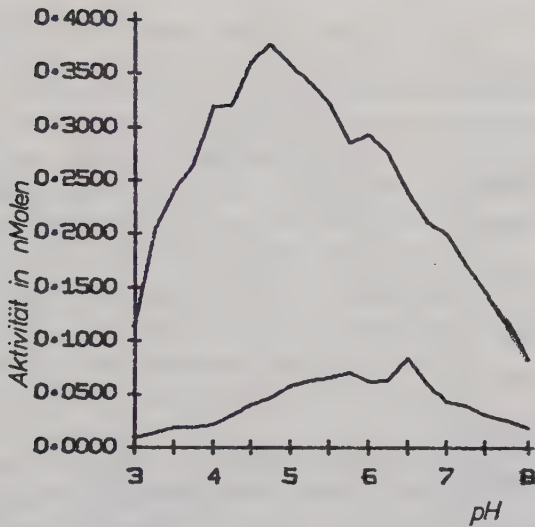


Abbildung 4c

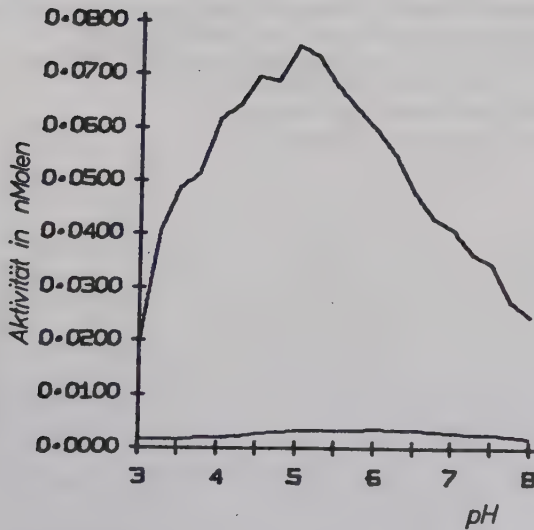
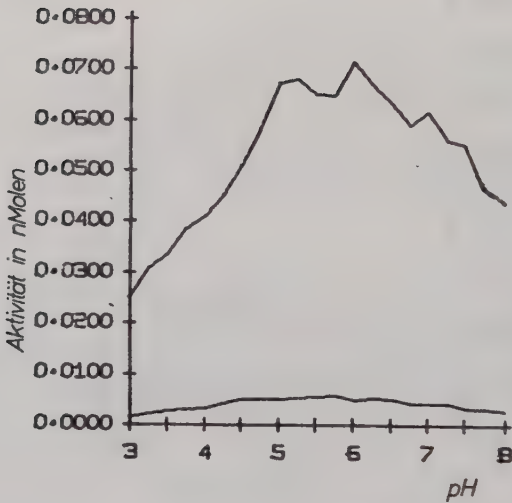


Abbildung 4d



Enzymaktivität im Urin verschiedener
Untersuchungsgruppen bei verschiedenen
pH-Gruppen vor und nach Dialyse (24 hrs in
10 mM Natriumphosphatpuffer pH 7)

obere Kurve vor der Dialyse

untere Kurve nach der Dialyse

4.3. Hitzeinaktivierung

Die Hitzeinaktivierungsversuche wurden unternommen, um festzustellen, ob die neutrale Maltase im Urin, ebenso wie die neutrale Maltase aus der Amnionflüssigkeit (8) stärker durch Hitzeinaktivierung gehemmt wird, als das saure Enzym. (Durchführung siehe 3.4.5.). Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5a bis 5d zusammengestellt, wobei jede Kurve die Werte eines Einzelurins aus jeder Gruppe enthält. Die prozentuale Hemmung betrug

- a) Schwangere bei pH4=85.3%, bei pH6=76.9%
- b) Säuglinge bei pH4=41.0%, bei pH6=40.9%
- c) Frauen bei pH4=64.5%, bei pH6=75.7%
- d) Pompe-Fall bei pH4= 0.0%, bei pH6=43.1%

Auffällig war dabei, daß normale Frauen und schwangere Frauen gegenüber normalen Säuglingen und Säuglingen mit M.Pompe eine insgesamt stärkere Hemmung über den gesamten untersuchten Bereich zeigten. Überraschenderweise fand sich bei einem Säugling mit M.Pompe (Patient K.H., Abb. 5d) sogar bei absolut sehr hoher Aktivität der sauren α -Glucosidase bei pH4 keinerlei Hitzeinaktivierung.

Abbildung 5a

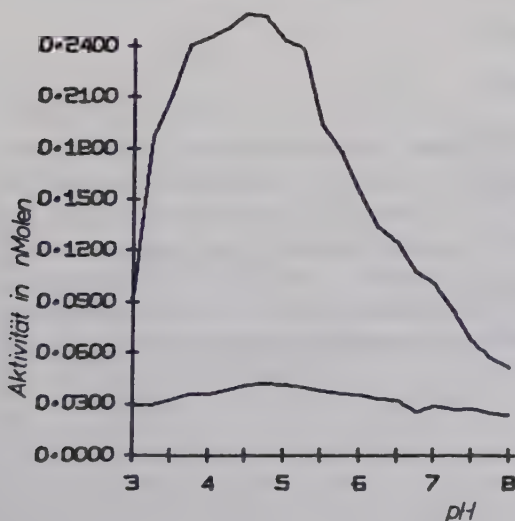


Abbildung 5b

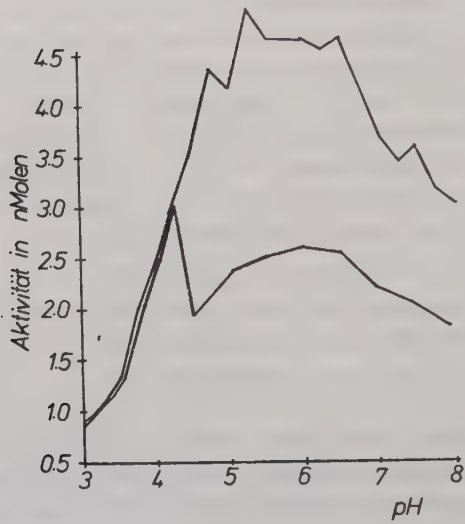


Abbildung 5c

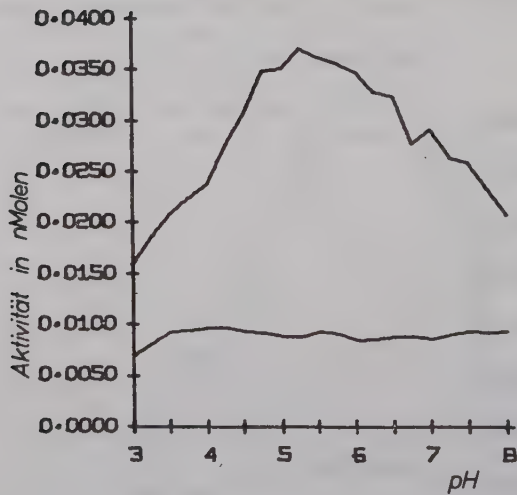
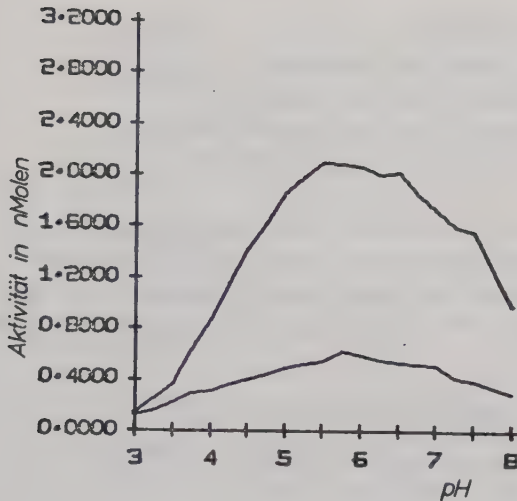


Abbildung 5d



Enzymaktivität im Urin verschiedener
Untersuchungsgruppen bei verschiedenen
pH-Werten vor und nach Hitzeinaktivie-
rung (30 Minuten bei 56°C und pH 5.0)

obere Kurve vor Hitzeinaktivierung

untere Kurve nach Hitzeinaktivierung

4.4. Turanose - Hemmung

Die Versuche mit Turanose-Hemmung (Durchführung siehe 3.4.3.) wurden unternommen, um durch den bekannten relativ stärkeren Effekt auf die saure α -Glucosidase (7) das angenommene Enzymgemisch im Urin zur besseren Differenzierung der verschiedenen untersuchten Gruppen besser sichtbar zu machen und so einen stärkeren Unterschied zwischen den Gruppen sehen zu können. Die beobachtete

Turanose-Hemmung betrug bei

- a) Schwangere bei pH4=79.0%, bei pH6=76.2%
- b) Säugling bei pH4=71.1%, bei pH6=73.9%
- c) Frau bei pH4=77.9%, bei pH6=64.2%
- d) Pompe-Fall bei pH4=51.8%, bei pH6=92.3%

Überraschenderweise war auch hier bei einem Säugling mit bekanntem M.Pompe (Patient P.P., Abb. 6d) die Turanose-Hemmung am geringsten, was einem relativ großen Anteil an echter lysosomaler, saurer α -Glucosidase entsprechen könnte.

Abbildung 6a

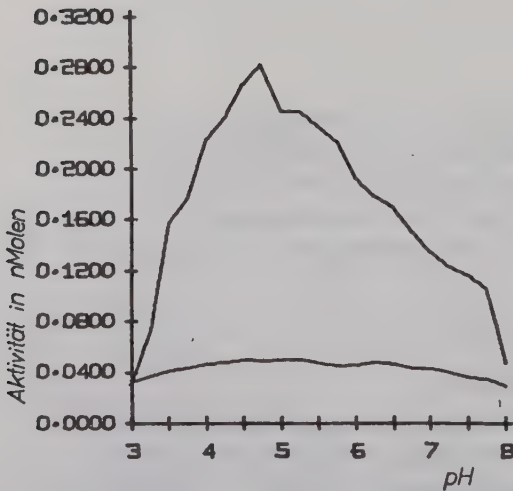


Abbildung 6b

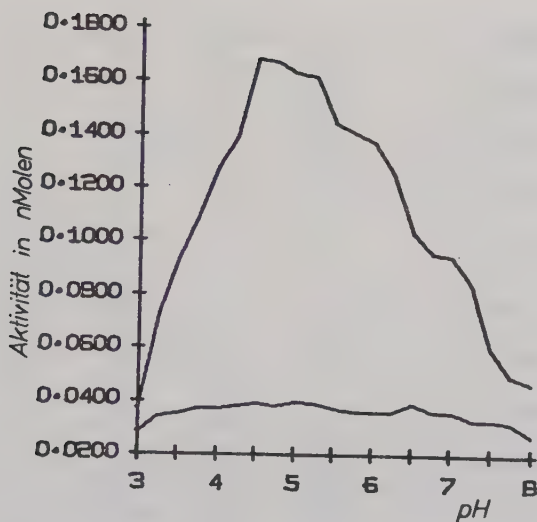


Abbildung 6c

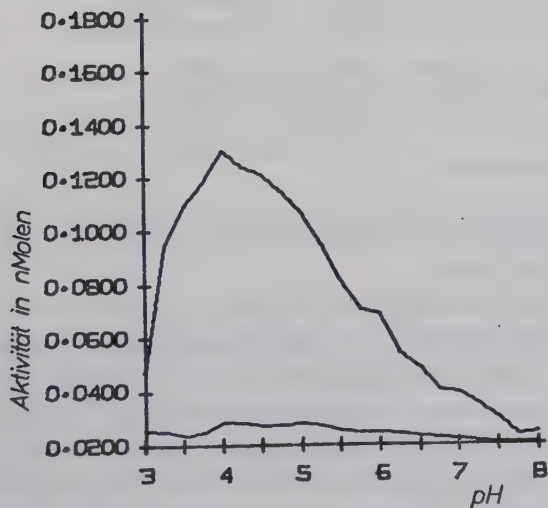
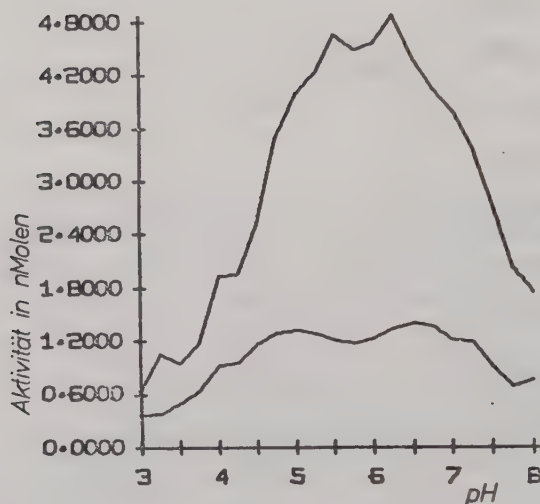


Abbildung 6d



Enzymaktivität im Urin verschiedener
untersuchter Gruppen bei verschiedenen
pH-Werten mit und ohne Turanose-Hemmung
obere Kurve ohne Turanose-Hemmung
untere Kurve mit Turanose-Hemmung

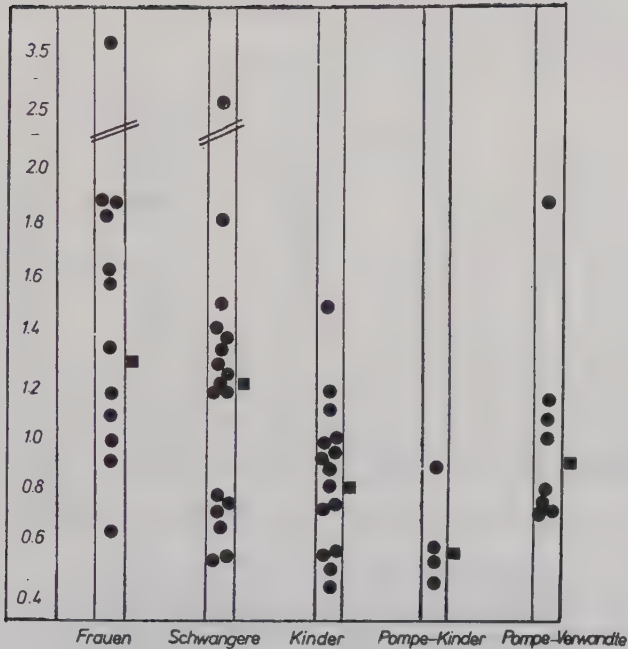
4.5. Quotienten-Bildung

4.5.1. Aufstellung der Quotienten aus der absoluten Aktivität bei pH4 und pH6

Durch die Bildung der Quotienten erreicht man eine Nivellierung der sonst außerordentlich weit auseinanderliegenden Absolutwerte. Wie in Abbildung 7 zu sehen, unterscheiden sich die Quotienten der verschiedenen Gruppen. Leider ergibt sich durch diese Quotienten keine völlige Trennung der verschiedenen Gruppen, sondern man erhält über weite Bereiche eine Überlappung. Die statistische Bearbeitung erfolgt in Abschnitt 4.5.2.

Abbildung 7

$\frac{pH4}{pH6}$



Graphische Darstellung der Quotienten, die aus den Enzymaktivitäten bei pH4 und pH6 bestimmt wurden. Der Medianwert ist in die Säule eingezeichnet (■).

4.5.2. Wilcoxon-Test zum Vergleich der Quotienten aus pH4 und pH6

Die statistische Bearbeitung der errechneten Quotienten (siehe 4.5.1.) erfolgte mit dem Wilcoxon-Test, (Durchführung siehe 3.5.1.). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

Auf dem 5%-Niveau besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen

Frauen gegen Kinder,
 Pompe-Kinder, P.-Verwandte
 Schwangere gegen Kinder, P.-Kinder
 Kinder gegen Pompe-Kinder
 Pompe-Kinder gegen Pompe-Verwandte

Tabelle 2

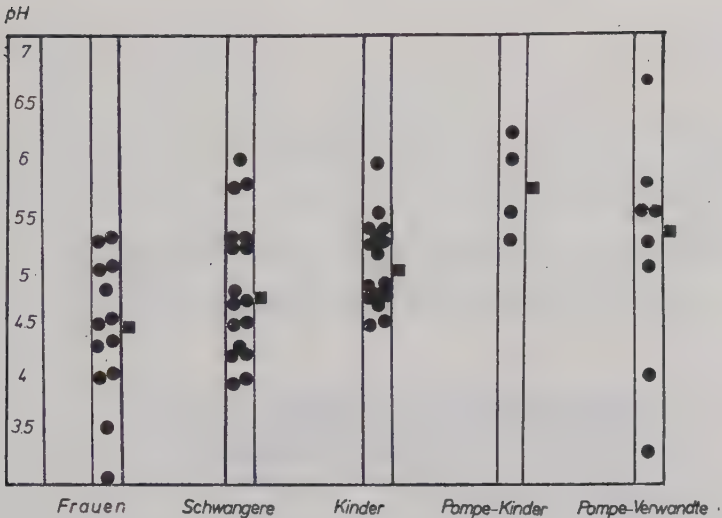
Schwangere	-			
Kinder	+	+		
Pompe-Kinder	+	+	+	
Pompe-Verwandte	+	-	-	+
	Frauen	Schwangere	Kinder	Pompe-Kinder

Ergebnisse des Wilcoxon-Tests als Gruppenvergleich der Quotienten aus den Enzymaktivitäten bei pH4 und pH6 von den verschiedenen untersuchten Gruppen. Als Grenze wird das 5%-Niveau angenommen.

4.6. Vergleich der pH-Optima

4.6.1. Aufstellung der pH-Optima

Abbildung 8



Graphische Darstellung der pH-Optima aller untersuchten Gruppen. Der Medianwert ist in die Säule jeweils eingezeichnet (■).

4.6.2. Wilcoxon-Test zum Vergleich der pH-Optima

Der Wilcoxon-Test wurde herangezogen, um bei den auf den ersten Blick nicht deutlich differenten Ergebnissen eine mögliche Unterscheidung herbeizuführen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Es läßt sich damit sagen, daß auf dem 5%-Niveau ein signifikanter Unterschied besteht zwischen folgenden Gruppen

Frauen gegen Kinder, Pompe-Kinder

Schwangere gegen Pompe-Kinder

Kinder gegen Pompe-Kinder

Tabelle 3

Schwangere	-			
Kinder	+	-		
Pompe-Kinder	+	+	+	
Pompe-Verwandte	-	-	-	-
	Frauen	Schwangere	Kinder	Pompe-Kinder

Ergebnisse des Wilcoxon-Tests als Gruppenvergleich der pH-Optima im Urin von verschiedenen untersuchten Gruppen. Als Grenze wird das 5%-Niveau angenommen.

4.7. Vergleich der Wilcoxon-Teste

Nach der Durchführung der beiden Wilcoxon-Tests bot sich an, die signifikanten Ergebnisse aus den unterschiedlichen Parametern zu vergleichen. Da beide Parameter (Quotient der Enzymaktivität bei pH4 und pH6 bzw. pH-Optima) eine Aussage über die Lage der Kurve geben, sollten vergleichbare Signifikanzen bestehen.

Wie in Tabelle 5 ganz augenfällig zu sehen, besteht zwischen beiden Prüfungen auf Signifikanz eine völlige Übereinstimmung bezüglich des Vergleiches von Pompe-Patienten mit allen anderen untersuchten Gruppen. Die übrigen Vergleiche fallen zum Teil unterschiedlich aus.

Tabelle 4

Schwangere	-	-							
Kinder	+	+	+	-					
Pompe-Kinder	+	+	+	+	+	+			
Pompe-Verwandte	+	-	-	-	-	-	+	-	
	Frauen		Schwangere		Kinder		Pompe-Kinder		

Vergleich der beiden Wilcoxon-Teste über den Quotienten aus pH4 und pH6 und über die pH-Optima

4.8. Auswertung der Parameter m_1 und m_2

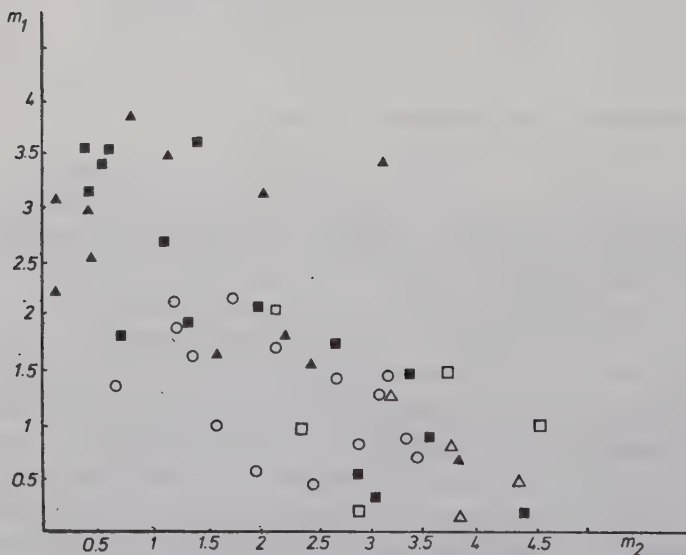
(Durchführung siehe 3.5.2.)

Auf der Suche nach einer graphischen Darstellung, die den Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, besonders den Pompe-Gruppen gegenüber den Kontrollgruppen aufzeigt, bot sich an, die Parameter m_1 und m_2 aus allen gemessenen Werten (Durchführung siehe 3.5.2.) gegeneinander in einem System aufzutragen. Bei dieser Zusammenstellung (Abb.9) zeigte sich nun tatsächlich, daß die Patienten mit M.Pompe sich in einem Feld befanden, das sich durch niedrige Werte von m_1 (0.2 bis 1.2) und besonders hohe Werte von m_2 (3.2 bis 4.4) auszeichnet. In derselben Gegend, allerdings mit größerem Schwankungsbereich für m_1 (0.4 bis 2.2) und m_2 (2.2 bis 4.6) finden sich auch die Verwandten der Pompe-Patienten, also Verdächtige auf Heterozygotie. Von den Kontrollgruppen setzte sich am meisten die Gruppe der Frauen von diesem Bereich ab, da sie sich vor allem in dem Teil des Quadranten zeigt, der durch hohe m_1 (1.7 bis 3.7) und

niedrige m_2 (0.2 bis 2.2) markiert ist. In dieser Gruppe fallen allerdings drei Werte etwas außerhalb des Rahmens. Die Werte der beiden anderen Kontrollgruppen (Schwangere und Säuglinge) sind ziemlich gleichmäßig über den Quadranten verteilt.

Aus diesem Ergebnis läßt sich der Schluß ziehen, daß bei Patienten mit M.Pompe der Anteil der sauren a-Glucosidase im Urin statistisch doch deutlich gegenüber den Anteilen (Nierenenzym, neutrales Enzym) vermindert ist, was ein größeres m_2 gegenüber m_1 bedingt.

Abbildung 9



Graphische Darstellung der, wie in 2.5.2. angeführt, ermittelten Parameter m_1 und m_2 .

■ = Schwangere, ▲ = Frauen, ○ = Säuglinge,
△ = Pompe-Kinder, □ = Pompe-Verwandte

5. Diskussion

Bei der Glycogenose Typ II (Morbus Pompe) besteht ein generalisierter Mangel an saurer alpha-Glucosidase in Herz, Leber, Leukozyten und kultivierten Fibroblasten (1, 14). Im menschlichen Urin läßt sich die Aktivität von mindestens zwei alpha-Glucosidasen bei normalen wie auch bei Personen mit Morbus Pompe nachweisen (10). Salafsky und Nadler versuchten, über die Messung der Enzymaktivität im Urin eine diagnostische Aussage über das Vorliegen eines M.Pompe zu erhalten. Für diesen Test beschrieben sie eine einfache Methode. Diesen Fluoreszenz-Test führten sie an 10 Säuglingen, 4 Personen zwischen 6 und 32 Jahren und 2 Patienten mit M.Pompe durch. Zusätzlich untersuchten sie das Verhalten der Enzymaktivität bei Inhibition durch Turanose (14, 8).

Die Messungen beschränkten sie auf die Aktivität bei pH4 und pH6 und fanden:

Bei pH4 zeigen die Patienten mit M.Pompe eine stark verminderte Aktivität der alpha-Glucosidase gegenüber den Kontrollgruppen. Um den Unterschied zwischen diesen Gruppen deutlicher darstellen zu können, bildeten sie für jeden Urin einen Quotienten aus pH4 und pH6. Der Quotient betrug bei Patienten mit Morbus Pompe 0.2 bzw. 0.4, bei den Kontrollen lag er bei 1.2 und darüber. Die Inhibition der alpha-Glucosidase mit Turanose ergab eine Hemmung von 77 - 98 % bei den Kontrollpersonen, bei den 2 Patienten mit M.Pompe betrug sie 50 - 55 %. Die daraus resultierenden Kurven sind in der Einleitung (Abb. 1) dargestellt und beschrieben.

Salafsky und Nadler stellten fest, daß die pH-Abhängigkeit der alpha-Glucosidase im Urin von Patienten mit M.Pompe ähnlich war derjenigen, die in der Niere von Pompe-Kranken und normalen Individuen (39) wie im Fruchtwasser von Schwangeren mit gesundem Föten und mit Föten mit Glycogenose Typ II gefunden wurden (9). Dagegen unterschied sich die

pH-Abhängigkeit der alpha-Glucosidase im Urin von Pompe-Patienten erheblich von dem Urin-Enzym der erwachsenen Kontrollgruppe. Auf Grund dieser Befunde postulieren sie die Diagnose des Morbus Pompe aus dem Urin. Statistische Maßnahmen zur Erhärtung dieser Annahme sind von ihnen nicht beschrieben worden.

Die Methode von Salafsky und Nadler wurde aus akutem Anlaß von uns nachvollzogen, wobei sich die Ergebnisse unserer Bestimmung stark von den beschriebenen Angaben unterschieden. Daraufhin wurden mehrere Einzelurine nachuntersucht, die aber die Unterschiede zwischen den Einzelergebnissen noch vergrößerten. Um diese divergierenden Ergebnisse statistisch fundieren zu können, stellten wir 4 Kollektive auf (siehe 3.2., Tab. 1, Abb. 3a - 3d).

Unser Testverfahren orientierte sich an der Methode von Salafsky und Nadler; als zusätzlichen Auswertungsmodus zur Bildung von pH_4/pH_6 nahmen wir statistische Hilfsmittel wie die Aufstellung der Parameter m_1 und m_2 (siehe 3.5.2.) und den Wilcoxon-Test (siehe 3.5.1.) in Anspruch.

Aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß die Gruppen Erwachsene, Kinder und Pompe-Patienten auch bei uns untereinander verschieden sind. Der Vergleich unserer Einzelmessungen mit denen von Salafsky und Nadler aber brachte folgende Ergebnisse: Es war möglich, aus den Kollektiven jeweils eine Kurve herauszusuchen, die in der Form der von Salafsky und Nadler beschriebenen (Abb.10a-c) entsprach (Abb.11a: Erwachsene, Abb.11b: Säugling, Abb.11c: Pompe). Ebenso konnte man aber in den jeweiligen Gruppen auch Kurvenverläufe finden, die ihre Optima bei ganz anderen pH-Werten hatten, und in der Form eher jeweils einer anderen Gruppe entsprachen (Abb.11a: Erwachsene, in der Form aber eher dem Säugling ähnlich, Abb.11b: Säugling, in der Form aber eher Erwachsenenem ähnlich (Abb.11c: Pompe, Form völlig neu).

Abbildung 10a

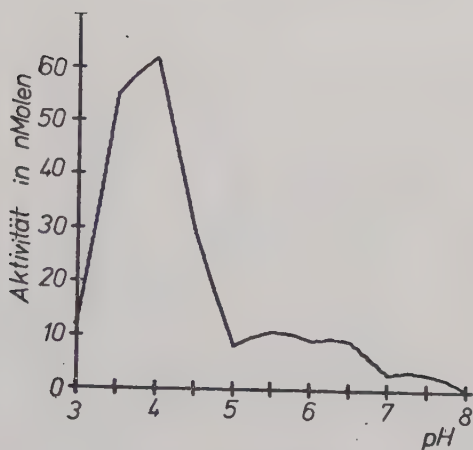


Abbildung 10b

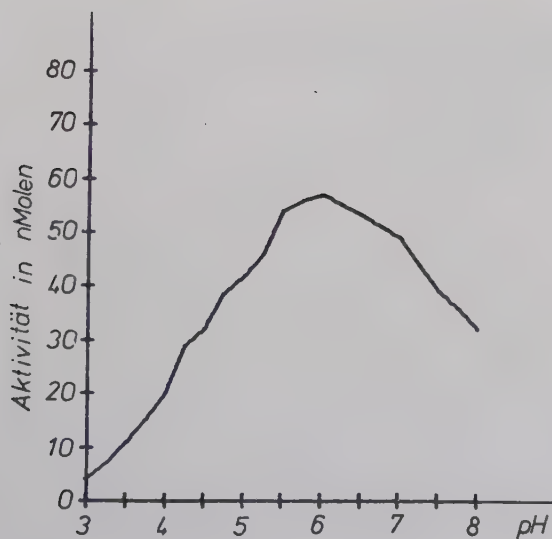
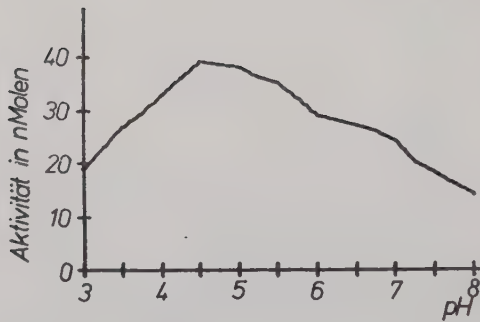


Abbildung 10c



Darstellung der Einzelkurven von
Salafsky und Nadler

a = Erwachsene

b = Säuglinge

c = Pompe-Fälle

Abbildung 11a

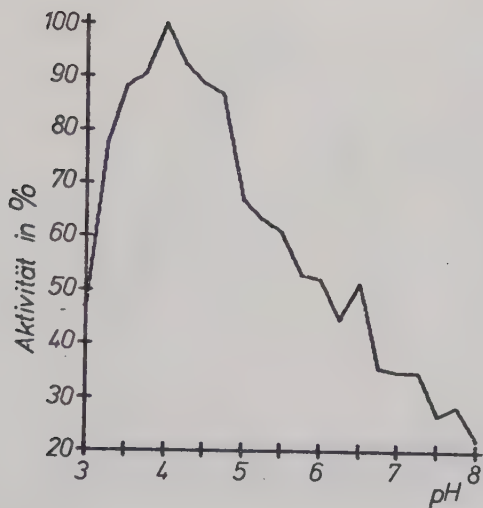


Abbildung 11b

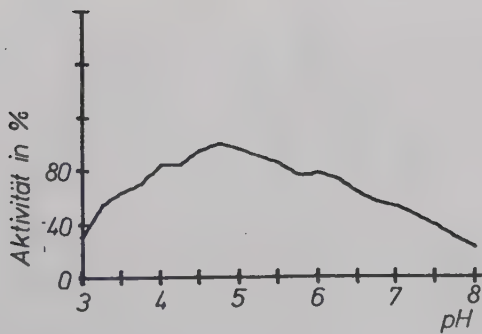
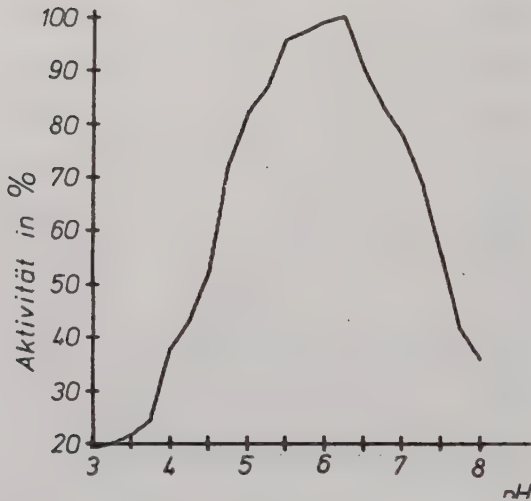


Abbildung 11c



Darstellung von Einzelkurven der untersuchten Gruppen, die den von Salafsky und Nadler angegebenen Kurven (Abb.1) ähnlich sind.

Abbildung 12a

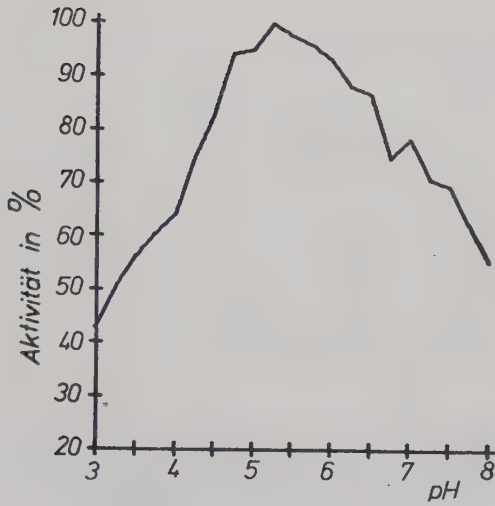


Abbildung 12b

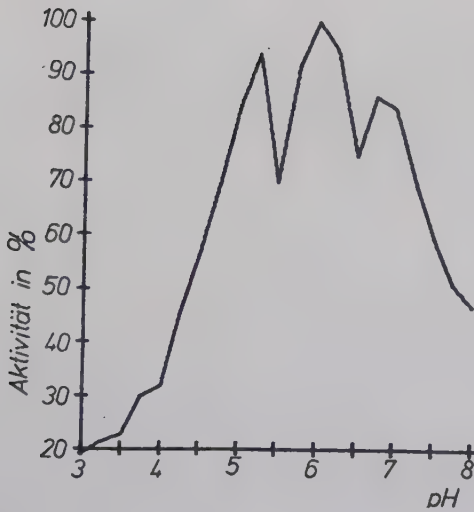
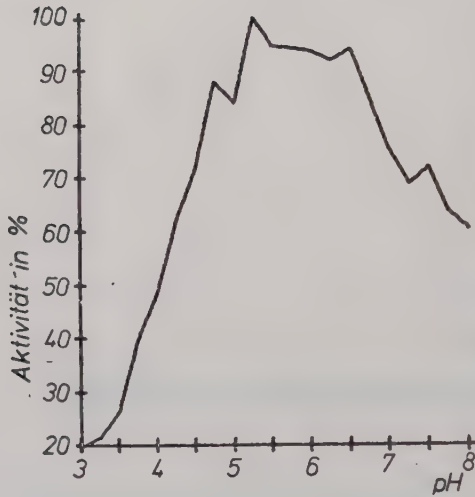


Abbildung 12c



Darstellung von Einzelkurven der untersuchten Gruppen, die sich in der Form stark von den von Salafsky und Nadler angegebenen Kurven (Abb.1) unterscheiden.

Auf Grund dieser Ergebnisse ist es also nicht möglich, einen bestimmten Kurventyp als Repräsentativ für jede Gruppe auszuarbeiten. Die tatsächlich unterschiedlichen Eigenschaften der Gruppen waren nur aus den statistischen Ergebnissen zu erkennen (Tab.5). Aus diesen Statistiken läßt sich jedoch über Einzelwerte keine Aussage machen, sondern nur ein Kollektiv-Vergleich anstellen. Dieselbe Feststellung läßt auch die graphische Darstellung der Parameter m_1 und m_2 zu (Abb.6), da auch hier keine eindeutige Zuteilung zu einer bestimmten Gruppe gemacht werden kann. Aus den einzelnen Meßwerten der Enzyme aus dem Urin kann also keine Diagnose des M.Pompe gestellt werden.

Die von Salafsky und Nadler beschriebene Turanose-Hemmung der alpha-Glucosidase von 77-98% bei Kontrollpersonen, bzw. 50-55% bei den Pompe-Fällen ließ sich nach den Ergebnissen unserer Testreihen nicht so scharf trennen. Die Inhibition bei den Kontrollpersonen stimmt in etwa mit den angegebenen Werten überein. Bei den 4 Pompe-Fällen zeigte sich, daß die Hemmung bei pH4 besonders niedrig ausfiel, während sie bei pH6 im Durchschnitt um 90% schwankte (siehe 4.3.)

Eine weitere Anregung zur Bearbeitung des Urins erhielten wir aus den Arbeiten von Fluharty und Mitarbeitern (9). Sie beschreiben eine starke Hitzelabilität der neutralen Maltase in der Amnionflüssigkeit bei einem pH von 5.8. Dieses neutrale Enzym verglichen sie mit einer sauren Maltase (pH 4.1) von Fibroblasten, die keine Reaktion zeigte. Das neutrale Enzym im Urin wurde von uns zwar bei einem höheren pH von 7.0 bestimmt und das saure Enzym entstammt ebenfalls dem Urin; dennoch versuchten wir festzustellen, ob sich die starke Hitzeinaktivierung auch bei der neutralen Maltase im Urin finden ließ, um eine bessere Trennung von neutraler und saurer alpha-Glucosidase zu erreichen.

In unserem Versuch (siehe 4.3.) trat jedoch eine so starke Inaktivierung der neutralen alpha-Glucosidase bei keiner der Gruppen ein, auch unterschieden sich die Wirkungen auf das saure und das neutrale Enzym nicht wesentlich. Es läßt sich also die Aussage Fluharty's über das Enzym in der Amnionflüssigkeit nicht ohne weiteres auf den Urin übertragen. Auffällig war bei unseren Versuchsergebnissen, daß die saure Maltase im Urin von Pompe-Patienten, unter vergleichbaren Bedingungen bearbeitet wie bei Fluharty, überhaupt keine Inaktivierung zeigte, während die neutrale Maltase (gemessen bei pH 6) zu 40% gehemmt war.

Grundsätzlich scheint das Enzym im Urin von Kindern hitzestabiler zu sein, als das Enzym im Urin Erwachsener (vergleiche Ergebnisse 4.3.: a und c gegenüber b und d).

5. Zusammenfassung

1973 berichteten Salafsky und Nadler über die Ergebnisse eines Fluoreszenztestes, nach denen es möglich sein sollte, die Diagnose des M.Pompe aus der Messung der Enzymaktivität im Urin zu stellen. Da die Resultate der bei uns nach ihren Angaben durchgeführten Testreihen keine Übereinstimmung mit ihren Ergebnissen zeigten, versuchten wir, mit Kontrollgruppen größeren Umfanges eine Überprüfung der Aussagen zu erhalten. Allein mit den Methoden von Salafsky und Nadler (Vergleich der Quotienten von pH 4, pH6 und Turanose-Hemmung) war es nicht möglich, eine allgemein gültige Aussage über das Vorliegen dieser Krankheit zu bekommen. Die aus diesem Grund angeschlossenen statistischen Auswertungen lassen zwar die Aussage zu, daß ein signifikanter Unterschied zwischen Pompe-Gruppe und Kontrollgruppe besteht, aber auf Grund der starken Überlappungen in allen Bereichen läßt sich der Schluß ziehen, daß diese Methode für eine Routine-Diagnostik des M.Pompe aus den Enzymmessungen im Urin nicht in Frage kommt.

Literatur:

- 1 Hers, H.G.:
Alpha-glucosidase Deficiency in generalized
glycogen-storage disease (Pompe's disease)
Biochem.J. 86, 11-16, 1963
- 2 Smith, H.L., Amick, L.D., Sydbury, J.B.:
Type II glycogenosis
Amer. J. Dis. Child. 111, 475-481, 1966
- 3 Steinitz, K., Rutenberg, A.:
Tissue alpha-glucosidase aktivty and glycogen
content in patients with generalized glycogenosis
Israel J. Med. Sci. 3, 411-421, 1967
- 4 Nitowsky, H.M., Grunfeld, A.:
Lysosomal glucosidase in type II glycogenosis
activity in leucocytes and cell cultures in
relation to genotype
J. Lab. Clin. Med. 69, 472-484, 1967
- 5 Dancis, J., Hutzler, J., Lynfeld, J., Cox, R.R.:
Absence of acid maltase in glycogenosis type II
(Pompe's disease) in tissue culture
Amer. J. Dis. Child. 177, 108-111, 1969
- 6 Williams, H.E.:
Alpha glucosidase activity in human leucocytes
Biochim. Biophys. Acta, 124, 34-38, 1966
- 7 Lejeune, N., Thinès-Sempoux, D., Hers, H.G.:
Intracellular distribution and properties of
alpha-glucosidases in rat liver
Biochem. J. 86, 16-21, 1963
- 8 Fluharty, A.L., Scott, M.L., Porter, M.T.,
Kihara, H., Wilson, M.G., Towner, J.W.:
Acid alpha glucosidase in amniotic fluid
Biochem. Med. 7, 39-51, 1973
- 9 Salafsky, I.S., Nadler, H.L.:
A fluorometric assay of alpha glucosidase and appli-
cation in the studies of Pompe's disease
J. Lab. Clin. Med. 81, 450-454, 1973
- 10 Franzini, C., Bonni, P.A.:
Alpha glucosidases in human urine
Clin. Chim. Acta 17, 505-510, 1967
- 11 Howell, P.R.:
The glycogen storage disease
in: Stanbury, Wyngaarden, Frederickson, editors:
Metabolic basis of inherited disease, ed.3,
New York, 1972, McGraw-Hill Book Bompamy, Inc.,
p.159-173

- 12 Salafsky, I.S., Nadler, H.L.:
Deficiency of acid apha-glucosidase in the
urine of patients with Pompe's disease
J. Pediatr. 82, 294-297, 1973
- 13 Ampola, M.G., Mahoney, M.J., Nakamura, E.,
Tanaka, K.:
Prenatal therapy of patients with vitamin B₁₂-
responsive methylmalonic acidemia
N. Engl. J. Med. 293, 313-317, 1975
- 14 Nadler, H.L., Messina, A.M.:
In utero detection of type II (Pompe's disease)
Lancet II, 1277-1278, 1969
- 15 Cox, R.P., Douglas, G., Hutzler, J., Lynfeld, J.,
Dancis, J.:
In utero detection of Pompe's disease.
Lancet I, 893-894, 1970
- 16 Nadler, H.L., Bigley, R.H., Hug, G.:
Prenatal detection of Pompe's disease.
Lancet II, 369-371, 1970
- 17 Schaub, J., Osang, M., von Bassewitz, D.B.,
Grote, W., Terinde, R., Lombeck, I., Bremer, H.J.:
Pränatale Diagnostik einer Glycogenose Typ II (Pompe)
mit nachfolgender Interruptio
Dtsch. Med. Wschr., 44, 2219-2222, 1974
- 18 Van Hoof, F., Hers, H.G.:
The abnormalities of lysosomal enzymes in Mucopoly-
saccharidoses
Eur. J. Biochem. 7, 34-44, 1968
- 19 Nadler, H.L.:
Antenatal detection of hereditary disorders.
Pediatrics 42, 912-918, 1968
- 20 Wilcoxon, F.:
Individual comparisons by ranking methods
Biom. Bull. 1, 80-84, 1945

Ich danke Herrn Professor Dr. Betke, Direktor des Dr. von Haunerschen Kinderspitals für die freundliche Überlassung des Arbeitsplatzes.

Ich danke ferner Herrn Priv.Do. Dr. Jürgen Schaub für die thematische Anregung dieser Arbeit und für seine Bereitwilligkeit, mich bei der Arbeit zu betreuen und die Ergebnisse mit mir zu erörtern.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Wiss.Ass. Dr. Osang, der mir mit wertvollen Ratschlägen bei der praktischen Durchführung der Experimente und deren Auswertung zur Seite stand.

L e b e n s l a u f

Am 19. Juli 1950 wurde ich als zweite Tochter des Richters Herbert Förster und seiner Ehefrau Martha, geborene Keylwert, Lehrerin, in Würzburg geboren.

In Kitzingen besuchte ich die Volksschule und anschließend acht Jahre den humanistischen Zweig des Armin-Knab-Gymnasiums. Da meine Eltern 1968 ihren Wohnsitz nach München verlegten, wechselte ich zu Beginn des 13. Schuljahres an das Städtische Luisengymnasium in München, wo ich 1969 die Reifeprüfung ablegte.

Nach einem Informationssemester begann ich 1970 das Studium der Human-Medizin und absolvierte 1973 das Physikum. Anfang 1974 begann ich den praktischen Teil der vorliegenden Arbeit, die ich im Frühjahr 1976 abschließen konnte.

Im Sommer 1976 beendete ich mein Studium mit dem Staatsexamen.

München, im Juli 1976

